Lane Medical Library

Aus dem physiologischen Institut der Universität zu Berlin.

Untersuchungen über das Verhalten der Harnsäure zu Organextrakten mit Hilfe der Folinschen Methode.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER

MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

AN DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT

ZU BERLIN

VON

Georg Landmann

approbiertem Arzt aus Lauter i. Sachsen.

Tag der Promotion: 4. August 1914.

STRASSBURG

VERLAG VON KARL J. TRÜBNER

1914

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin.

Referent: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. **Rubner.**

Aus Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 92.

M. DuMont Schauberg, Straßburg.

Meinen Eltern

zugeeignet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/untersuchungenub0000gorg

Unsere heutigen Auffassungen über die Stellung der Harnsäure im intermediären Stoffwechsel haben sich schrittweise mit den verbesserten Methoden ihrer Bestimmung und mit der Erforschung ihrer Konstitution und der Konstitution der Purinbasen gebildet. Verhältnismäßig früh entwickelte sich die Auffassung der Harnsäure als eines intermediären Stoffwechselproduktes, das im Organismus der Säuger entsteht und weiter abgebaut wird, eine Anschauung, die heute noch vertreten wird. Aber während man früher die Harnsäure als ein Zwischenprodukt des Abbaues der Eiweißkörper überhaupt ansah, gewissermaßen als das obligatorische Zwischenglied zwischen den Proteinen und dem Harnstoff, hat sich allmählich die Überzeugung Bahn gebrochen, daß sie das intermediäre Abbauprodukt einer ganz speziellen Gruppe von Körpersubstanzen, der Nucleoproteide, ist. Einen solchen Zusammenhang mußte schon die Erforschung der Konstitution der Purinbasen einerseits und der Harnsäure andererseits wahrscheinlich machen; der direkte Beweis wurde dadurch geführt, daß bei Fütterungsversuchen mit nucleinreicher Nahrung die Menge der Harnsäure im Harn anstieg.

Neben den Fütterungsversuchen wurden zahlreiche Versuche über das Verhalten der Harnsäure gegen Organextrakte angestellt. Die ersten Versuche in dieser Richtung verdanken wir Horbaczewski, der bei der Digestion von Milzpulpa, unter Luftdurchleitung und bei einem mäßigen Grad von Fäulnis, eine Harnsäurebildung beobachtete. Er deutete seine Versuche

so, daß die Harnsäure aus kernreichem Material besonders leicht entsteht, und seine Anschauung, daß die Hauptmenge der im lebenden Organismus vorkommenden Harnsäure aus den an Nucleinsubstanzen reichen weißen Blutkörperchen stammen sollte, war nur quantitativ, nicht aber qualitativ unrichtig. Ihm folgte zunächst Spitzer, der auch bei Ausschluß von Fäulnis allein durch die Organfermente eine Harnsäurebildung beobachtete und zwar sowohl aus präformiertem, in den Organauszügen selbst vorhandenem Material, als auch aus zugesetzten Purinbasen. Er stellte dabei fest, daß Adenin und Guanin eine größere Resistenz gegen die abbauenden Fermente besitzen als Xanthin und Hypoxanthin.

In größerem Stile wurden diese Versuche weiterhin fortgesetzt, besonders von Schittenhelm, sowie von Jones und ihren Schülern. Während früher die freien Basen im Vordergrund der Untersuchung standen, rückten allmählich mit zunehmender Erkenntnis ihres Baues die Nucleinsäuren in die erste Linie bezw. ihre komplizierteren glykosidartigen Abbauprodukte. Die Versuche der einzelnen Forscher blieben untereinander nicht ohne Widersprüche, aber es ging doch deutlich aus ihnen hervor, daß es gelingt, zu Organextrakten zugesetzte Purinbasen in Harnsäure überzuführen. Dabei handelt es sich offenbar um ein Nebeneinanderhergehen verschiedener fermentativer Prozesse. Zunächst wird durch Desamidasen aus Guanin und Adenin die Amidogruppe abgespalten. Gleichzeitig wird das desamidierte Kohlenstoffatom oxydiert. Dabei entsteht aus Guanin Xanthin, aus Adenin Hypoxanthin, ein Vorgang, der zum ersten Mal von Schindler bei Fäulnisversuchen beobachtet wurde. Das aus Guanin bezw. Adenin entstehende Xanthin und Hypoxanthin werden dann durch Oxydationsfermente («Xanthinoxydase») weiter zur Harnsäure abgebaut. Ein solcher Abbau muß für die Fermente leicht sein; im Reagensglasversuch war er lange Zeit vergeblich versucht worden, bis es H. Fischer gelang, aus diazotiertem Xanthin Harnsäure zu erhalten. Nach Schittenhelm sollen die Desamidasen auch bei Luftabschluß, dagegen die Oxydasen nur bei Luftdurchleitung wirken.

Ein Weiterabbau der Harnsäure im Organismus war durch Fütterungsversuche schon durch Wöhler und Frerichs festgestellt worden. Er ließ sich nunmehr auch durch Fermentversuche erweisen. Namentlich durch Schittenhelm sind «urikolytische Fermente» in zahlreichen Organen nachgewiesen worden. Der Abbau der Harnsäure geht bis zum Harnstoff, als Zwischenprodukt wird namentlich das Allantoin angenommen. Die verschiedenen Organe verschiedener Tiere verhalten sich in Bezug auf ihre Fähigkeiten des Harnsäureabbaues verschieden; daraus erklären sich auch zum Teil die sich manchmal widersprechenden Angaben der verschiedenen Autoren. Auch die Intensität der Harnsäurebildung ist bei verschiedenen Tieren und verschiedenen Organen nicht gleichmäßig ausgeprägt gefunden worden.

Alle diese früheren Versuche über Harnsäurebildung und -Zerstörung durch Organextrakte waren nun an Methoden zur Bestimmung der Harnsäure wie die von Ludwig-Salkowski, Hopkins, Folin-Schaffer gebunden, die einerseits verhältnismäßig recht zeitraubend waren und anderseits nur bei Anwesenheit ziemlich großer Mengen von Harnsäure genügend genaue Resultate gaben. Es mußten daher den Organextrakten die Harnsäure und die Harnsäurebildner in Konzentrationen zugesetzt werden, die die im Organismus vorhandene, physiologische Konzentration dieser Stoffe erheblich überschritt. Ferner mußte nach einer gewissen Reaktionszeit meist das ganze Gemisch zur Bestimmung der Harnsäure verarbeitet werden, da die vorhandenen Methoden für die Bestimmung der Harnsäure in kleineren, dem Gesamtgemisch entnommenen, Portionen nicht geeignet waren. Es mußte daher darauf verzichtet werden, den Reaktionsverlauf, d. h. die Harnsäurebildung und -Zerstörung, zeitlich schrittweise zu verfolgen, etwa kurvenmäßig festzulegen und namentlich ein etwaiges Nebeneinanderhergehen von Harnsäurebildung und -Zerstörung in demselben Organextrakt zu erweisen.

Vor einiger Zeit nun wurde von Folin und seinen Mitarbeitern ein neues colorimetrisches Verfahren der Harnsäurebestimmung angegeben, das die genannten Nachteile früherer

Bestimmungsmethoden in weitgehendem Maße zu vermeiden scheint. Denn bei einer relativ leichten und raschen Ausführbarkeit gestattet es die Bestimmung der Harnsäure noch in Bruchteilen eines Milligramm, kann also als eine wirkliche «Mikromethode» bezeichnet werden, die gerade für das Studium der Harnsäurebildung und -Zerstörung in Organextrakten besonders geeignet erscheinen mußte.

Das Folinsche Verfahren ist seit seiner Veröffentlichung mit Erfolg für die Bestimmung der Harnsäure im Blut[1]) angewandt worden. Auf Anregung von Herrn Prof. Steudel entschloß ich mich nun, es auf seine Verwendbarkeit für das Studium der Harnsäurezerstörung und -Bildung in Organextrakten zu untersuchen.

Das Prinzip dieses colorimetrischen Verfahrens beruht auf der Fähigkeit der Harnsäure, eine nach bestimmten Vorschriften hergestellte Phosphorwolframsäure zu reduzieren. Dabei entsteht nach der Anschauung Folins eine saure Substanz von unbekannter Konstitution, die mit Alkali ein blaues Farbsalz gibt. Die Intensität der Färbung, die man auf diese Weise in einer zu untersuchenden Harnsäurelösung hervorrufen kann, wird mit derjenigen verglichen, die eine bekannte Menge Harnsäure, mit denselben Reagenzien behandelt, gibt. Da verschiedene im Organismus vorkommende Stoffe, vor allem mehrwertige Phenole wie Hydrochinon, Brenzkatechin, Adrenalin dieselbe blaue Farbenreaktion geben, so muß der colorimetrischen Bestimmung der Harnsäure ihre Isolierung als Magnesia-Silbersalz vorausgehen.

Die Einzelheiten der technischen Ausführung der Bestimmung sind von Folin und seinen Mitarbeitern mehrfach ausführlich publiziert worden; auch Steinitz (l. c.) gibt eine ausführliche Darstellung der von ihm angewandten Methodik an. Da wir indessen in unserer Methodik in einzelnen Punkten von den genannten Autoren etwas abgewichen sind, so sei es gestattet, hier noch einmal kurz das Verfahren so wie wir es anwandten, zu beschreiben. Gerade bei einer colorime-

[1]) Steinitz, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 90, S. 108.
Bass, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., Bd. 76, S. 40.

trischen Bestimmung ist es wesentlich, daß immer in derselben Weise gearbeitet wird.

Enteiweißung.

Von den Organextrakten, deren Herstellung weiter unten beschrieben werden soll, wurden zu einer Bestimmung je 5 ccm, nach sorgfältigem Umschütteln der ganzen Flüssigkeit, abpipettiert und in ein 100 ccm Becherglas fließen lassen, in dem ca. 50 ccm Wasser und 3 Tropfen doppelt normale Essigsäure zum Sieden erhitzt worden waren. (Im Falle, daß dem Organextrakt zur Lösung der Purinbasen Alkali zugesetzt worden war, wurde entsprechend mehr Essigsäure zugegeben. Zuviel Essigsäure darf auch nicht zugegeben werden, da sonst die Ausflockung des Eiweißes mangelhaft ist). Nach Zusatz eines reichlichen Löffels Talcum wurde nun die Mischung von 5 ccm Organextrakt und verdünnter Essigsäure zum Sieden erhitzt und, eventuell unter weiterem Talcumzusatz und Umrühren mit einem Glasstab, das Aufkochen so oft wiederholt, bis die Koagulation des Eiweißes vollständig war. Dieser Zeitpunkt wurde daran erkannt, daß die ungelösten Partikel in der Flüssigkeit sich zu groben Ballen zusammenfügten, während die Flüssigkeit fast völlig klar und durchsichtig wurde. Bei einiger Erfahrung ließ sich dieser Zustand fast immer hervorrufen; nachdem dann in ein 200 ccm Becherglas abfiltriert worden war, war das Filtrat völlig klar, nicht mehr opalescent, von leicht gelblicher Färbung.[1]) Die Flüssigkeit passierte bei dieser Art des Verfahrens das Filter gewöhnlich sehr rasch. Der Filterrückstand wurde nun mit Hilfe eines kleinen Spatels möglichst vollständig in das 100 ccm Becherglas zurückgebracht, nochmals mit ca. 50 ccm Wasser

[1]) Auch Steinitz (l. c.) bedient sich zur Enteiweißung des Blutes einer verdünnten Essigsäurelösung und des Zusatzes von Talcum; doch geht er so vor, daß er zunächst das Blut in einer verdünnten Essigsäurelösung aufkocht, filtriert und das opalescente Filtrat durch nochmaliges Aufkochen, diesmal unter Talcumzusatz, völlig enteiweißt und zum zweiten mal filtriert. Bei unserer Methodik wird die völlige Enteiweißung gleich vor dem ersten Filtrieren vorgenommen.

aufgekocht und durch dasselbe Filter in das 200 ccm Becherglas filtriert. Danach wurden in dem 100 ccm Becherglas nochmals 50 ccm Wasser zum Sieden erhitzt und nochmals durch dasselbe Filter filtriert.

Einengung.

Die Einengung des gesamten Filtrats in dem 200 ccm Becherglas erfolgte auf dem Wasserbad, nachdem die Flüssigkeit durch Zugabe von Essigsäure deutlich sauer gemacht worden war. Die Einengung wurde bis auf ca. 1—2 ccm fortgesetzt. In diesem Zustand war das Filtrat schwach gelblich gefärbt, aber klar, wenngleich die gelösten Substanzen teilweise auskrystallisierten. (Verdampfen bis zur Trockne beeinträchtigt nach unseren Erfahrungen zwar die Versuchsresultate nicht erheblich, ist aber doch zu vermeiden wegen der dabei auftretenden störenden Farbstoffbildung).

Das eingeengte Filtrat wurde nunmehr mit Hilfe eines Glasstäbchens in ein Zentrifugenröhrchen übergeführt und danach das Becherglas mit je 2—3 ccm 1%iger Lithiumcarbonatlösung 3 mal nachgespült, wobei etwa festhaftende Teilchen durch Reiben mit einem kleinen Glasstab von der Wand des Becherglases losgelöst wurden. In dem vereinigten im Zentrifugenröhrchen befindlichen Filtrat + Spülflüssigkeit wurde nunmehr die Silbermagnesia-Fällung der Harnsäure vorgenommen.

Silbermagnesia-Fällung.

Folin schreibt hier die aufeinanderfolgende Zugabe von 6 Tropfen einer 3%igen Silberlaktatlösung, 2 Tropfen Magnesiamixtur und 10—20 Tropfen konzentrierten Ammoniaks bis zur Lösung des gebildeten Chlorsilbers vor. Wir zogen es aber vor, die Bildung des Chlorsilbers überhaupt zu vermeiden, indem wir zu der Flüssigkeit in dem Zentrifugenröhrchen auf einmal eine vorher in einem Reagensglas hergestellte Mischung von 20 Tropfen konzentrierten Ammoniaks, 8 Tropfen 3%iger Silberlactatlösung und 4 Tropfen Magnesiamixtur gaben. Die Bildung des Niederschlags trat darauf fast momentan ein,

doch dauerte es eine Zeit lang, bis sie maximal war. Leichtes Bewegen des Zentrifugenröhrchens, eventuell das Einwerfen einer kleinen Siedeperle, beförderte die Verteilung der zugesetzten Ag-Mg-Mischung in der Flüssigkeit und das Ausfallen der Silbermagnesiaverbindung der Harnsäure, die zunächst in gelartig aussehenden Flocken in der Flüssigkeit suspendiert war, allmählich aber zu Boden sank. Das Gemisch wurde vor dem Zentrifugieren einige Stunden, gewöhnlich über Nacht, stehen gelassen.

Hierauf wurde einige Minuten lang scharf zentrifugiert und dann die überstehende schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit von dem Zentrifugat abgegossen.[1]) Zu dem Rückstand am Boden des Zentrifugenröhrchens wurden nun, um die Harnsäure aus ihrer Silbermagnesiaverbindung frei zu machen, 6 Tropfen frisch gesättigten Schwefelwasserstoffwassers und 2 Tropfen konzentrierte Salzsäure gegeben (Folin schreibt 1 Tropfen Salzsäure vor, doch kam es bei unseren Versuchen bisweilen vor, daß nach dem Hinzufügen der Phosphorwolframsäure bereits vor Zugabe des Alkalis Blaufärbung auftrat, wenn nur 1 Tropfen HCl verwandt worden war. Um dies zu vermeiden und die Reduktion des Reagens bis zum Schluß bei saurer Reaktion vor sich gehen zu lassen, zogen wir es vor, 2 Tropfen HCl zuzugeben). Die nun folgende Abweichung unserer Methodik von der Folinschen Originalvorschrift scheint mir von etwas größerer Bedeutung zu sein. Während nämlich Folin den Rückstand am Boden des Zentrifugenröhrchens mit den wenigen Tropfen zugesetzten SH_2-Wassers und HCl ohne weitere Verdünnung zwecks Austreibung des Schwefelwasserstoffs erhitzt, zogen wir es vor, die Flüssigkeit in dem Zentrifugenröhrchen, nachdem der Bodensatz mit Hilfe eines spitz ausgezogenen Glasstabes umgerührt worden war, durch

[1]) Bass, (l. c.) hält es für wichtig, um alle Harnsäure auszufällen, zu der stark ammoniakalischen Flüssigkeit so lange Silbersalz zuzusetzen, bis Chlorsilber ausfällt. Wir haben uns aber davon überzeugt, daß es nach Ausfällung der Harnsäure nach dem von uns geübten Verfahren nicht mehr gelang, aus der über dem Zentrifugat stehenden Flüssigkeit durch weiteren Zusatz von Silberlaktat bis zum Ausfallen des AgCl noch mehr Harnsäure zu isolieren.

Zusatz von 5 ccm Wasser zu verdünnen. (Auch Steinitz gibt an, daß er 1 ccm Wasser zu der SH_2 und HCl enthaltenden Mischung zugesetzt hat).

Dieser Zusatz von Wasser zu dem Schwefelwasserstoffwasser und der Salzsäure scheint nun für die Resultate der Bestimmungen nicht ohne Bedeutung zu sein. Solange ich mich bei meinen Vorversuchen mit abgewogenen Mengen reiner Harnsäure genau an die Originalvorschrift hielt, erhielt ich dauernd recht unbefriedigende Resultate. Auf Rat von Herrn Prof. Steudel versuchte ich es, durch den erwähnten Wasserzusatz zu besseren Resultaten zu gelangen. Daß dies in der Tat durch diese scheinbar belanglose Modifikation möglich ist, ist aus dem Vergleich von Tabelle I und II ersichtlich. Allerdings ist mit dieser Zugabe von Wasser der Nachteil verbunden, daß das Vertreiben des Schwefelwasserstoffs erheblich längere Zeit in Anspruch nimmt, als bei dem ursprünglichen Verfahren. Bei dem von uns angewandten Grade der Verdünnung mußten die Zentrifugenröhrchen mindestens 1 Stunde lang in einem kochenden Wasserbad stehen, bis aller Schwefelwasserstoff ausgetrieben war. Da er das Phosphorwolframsäurereagens ebenfalls reduziert, ist es außerordentlich wichtig, ihn quantitativ zu entfernen. Dieser Punkt wurde einmal daran erkannt, daß die Flüssigkeit in dem Zentrifugenröhrchen den charakteristischen Geruch des Schwefelwasserstoffs nicht mehr aufwies und daß 1 Tropfen 0,5%iger Bleiacetatlösung keine bräunliche Färbung der Flüssigkeit mehr hervorrief. (Trat Braunfärbung ein, so wurde natürlich weiter erhitzt.) Um ganz sicher zu gehen, gab ich gewöhnlich zum Schluß noch einige Tropfen der Bleiacetatlösung hinzu, um etwa vorhandene Reste von SH_2 unschädlich zu machen.

Die vom Schwefelwasserstoff befreite Lösung im Zentrifugenröhrchen war gewöhnlich ganz schwach gelblich gefärbt. Wenn, was gelegentlich vorkam, größere Mengen von Farbstoff vorhanden waren, so trat auf Zusatz von ca. 10 Tropfen einer 10%igen Natriumacetatlösung eine gewisse Aufhellung der Flüssigkeit ein. Am Boden des Zentrifugenröhrchens befand sich das gebildete Schwefelsilber usw. gewöhnlich in

kleinen Mengen, zu kleinen Flocken zusammengeballt. Für die nun folgende kolorimetrische Bestimmung waren diese geringen Mengen meist belanglos; falls der Inhalt des Röhrchens sehr getrübt war, wurde noch einmal zentrifugiert.

Kolorimetrische Bestimmung.

Die in den Röhrchen befindliche Flüssigkeit wurde nun je nach der zu erwartenden Menge Harnsäure quantitativ in ein Meßkölbchen von 50, 100 oder 200 ccm übergeführt, das Röhrchen mehrmals mit Wasser ausgespült und dieses Spülwasser ebenfalls in das Meßkölbchen gebracht. Zugleich wurde die Vergleichslösung vorbereitet, indem 1 ccm einer mindestens jede Woche neu hergestellten Lösung von 0,1 g durch Kjeldahl-Bestimmungen auf ihre Reinheit geprüfter Harnsäure in 11 bis 12 ccm[1]) einer 0,4%igen Lithiumcarbonatlösung, die auf 100 ccm verdünnt worden waren, genau in einen 100 ccm Meßkolben pipettiert wurde. Danach wurden möglichst gleichzeitig in alle Meßkölbchen, also zu der Vergleichslösung und zu den zu untersuchenden Flüssigkeiten, je 2 ccm des von Folin angegebenen «Harnsäurereagens»[2]) gegeben. Nach leichtem Umschütteln erfolgte die ebenfalls möglichst gleichzeitige Zugabe von 20 ccm gesättigter Sodalösung in die 100 ccm Meßkolben, bezw. von 10—15 ccm in die 50 ccm Meßkolben, worauf im Falle der Anwesenheit von Harnsäure die farblose bezw. schwach grünlich gefärbte Flüssigkeit in den Meßkolben sofort eine schöne tiefblaue Färbung annahm. Die Meßkolben wurden darauf bis zur Marke aufgefüllt, sorgfältig umgeschüttelt und nun ohne Zögern die Bestimmung vorgenommen, da die blaue Farbe ziemlich rasch verblaßt.

---

[1]) Folin schreibt für die Lösung von 0,1 g Harnsäure 10 ccm 0,4%iger Lithiumcarbonatlösung vor. Diese Menge erwies sich für uns nicht als ganz ausreichend.

[2]) Herstellung des Harnsäurereagens: Eine Mischung von 750 ccm Wasser, 100 g Natriumwolframat (Kahlbaum) und 80 ccm 84%iger Phosphorsäure werden 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Erkalten wird die schwach grün gefärbte Flüssigkeit in einen 1000 ccm Meßkolben filtriert und dieser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Vergleichslösung wurde in den einen, die zu untersuchende Lösung in den anderen Trog des Duboscqschen Kolorimeters gebracht und die Schichtdicke der Vergleichslösung auf eine bestimmte Marke eingestellt, meist auf 20 mm, bei Anwesenheit sehr geringer Mengen von Harnsäure in der zu untersuchenden Flüssigkeit auch gelegentlich auf 10 mm. Die Schichtdicke der zu untersuchenden Flüssigkeit wurde mittelst der Schraubeneinrichtung bis zur gleichen Farbstärke wie die der Vergleichslösung variiert. Es wurden jeweils insgesamt 7 Ablesungen gemacht, die meist untereinander nicht mehr als um 1 mm differierten und dann das Mittel aus diesen 7 Ablesungen für die Berechnung der Harnsäure zugrunde gelegt. Um gut übereinstimmende Ablesungen zu erhalten, ist natürlich eine gewisse Übung erforderlich.

Berechnung der Harnsäuremenge.

Die Berechnung ist einfach: Die Mengen der Harnsäure in den beiden verglichenen Lösungen sind umgekehrt proportional den Schichtdicken, bei denen die beiden Lösungen den gleichen Farbenton haben und sie sind direkt proportional der Anzahl Kubikzentimeter auf die sie verdünnt wurden. Der Harnsäuregehalt, die Verdünnung und die Schichtdicke der Vergleichslösung sind stets konstant: Sie betragen 1 mg, 100 ccm bezw. 20 oder 10 mm. Für die Berechnung ist es praktisch, die abgelesene Schichtdicke der unbekannten Lösungen auf eine Schichtdicke von 10 mm der Standardlösung und auf eine Verdünnung der unbekannten Lösung auf 100 ccm umzurechnen.

Beispiel: Die unbekannte Lösung ist auf 100 ccm verdünnt; die Schichtdicke der Vergleichslösung und der unbekannten Lösung betragen 20 und 12,4 mm oder, auf 10 mm der Schichthöhe der Vergleichslösung bezogen, beträgt die Schichthöhe der unbekannten Lösung 6,2 mm. Da die Vergleichslösung 1 mg Harnsäure enthält, muß die unbekannte Lösung $\frac{10}{6{,}2}$ mg enthalten. Man braucht nur den dekadischen Logarithmus von 6,2 vom Logarithmus von 10, der 1 beträgt, abzuziehen, um den Logarithmus der gesuchten Menge Harn-

säure, in Milligrammen ausgedrückt, zu erhalten. Die ganze Berechnung kommt also auf das Aufsuchen der dekadischen Ergänzung des Logarithmus der halben abgelesenen Schichthöhe der unbekannten Lösung heraus.

log. 6,2	0,79239
Dekad. Erg.	0,20761
Harnsäure	1,61 mg

Bei anderen Verdünnungen der unbekannten Lösung und bei anderer Schichthöhe der Vergleichslösung muß natürlich die Berechnung entsprechend modifiziert werden.

Prüfung der Methode.

Bevor wir an unsere eigentlichen Versuche mit Organextrakten herangingen, haben wir die Verwendbarkeit der Bestimmung durch zahlreiche Vorversuche mit bekannten Mengen Harnsäure geprüft. Genau abpipettierte Mengen einer Harnsäure-Lithiumcarbonatlösung, die 1 mg Harnsäure im Kubikzentimeter enthielt, wurden, wie beschrieben der Silbermagnesiafällung usw. unterworfen und dann mit einer Standardlösung verglichen, die mit 1 ccm derselben Lösung hergestellt worden war, also wie gewöhnlich 1 mg reine Harnsäure enthielt. Wie schon erwähnt, waren unsere Versuche anfangs sehr unbefriedigend, solange wir die Harnsäure in dem Zentrifugenröhrchen mit wenigen Tropfen SH_2-Wasser und HCl unverdünnt erhitzten.

Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, fanden wir von 1 mg Harnsäure im Mittel 85%, von 2 mg 60% wieder, während bei Verarbeitung von 3 und mehr Milligramm der erhaltene Wert bereits um mehr als 50% hinter dem berechneten zurückblieb.

Es gelang uns nun in der Folge durch Zusatz von 5 ccm Wasser zu der mit SH_2 und HCl erhitzten Harnsäure, die Resultate unserer Bestimmungen erheblich zu verbessern, wie aus Tabelle II ersichtlich ist.

Tabelle I.

Erhitzen der Harnsäure mit wenigen Tropfen SH_2-Wasser und HCl ohne weitere Verdünnung.

1 mg		2 mg		3 mg		5 mg		10 mg	
Gefunden mg	Wiedergef. %	Gef. mg	%	Gef. mg	%	Gef. mg	%	Gef. mg	%
0,80	80	1,36	68	1,44	48	1,14	23	1,47	15
0,84	84	1,26	63	—	—	—	—	—	—
0,82	82	1,20	60	—	—	—	—	—	—
0,85	85	1,00	50	—	—	—	—	—	—
0,90	90	1,18	59	—	—	—	—	—	—
0,91	91	1,18	59	—	—	—	—	—	—
im Mittel:	85		60	—	48	—	23	—	15

Tabelle II.

Erhitzen der Harnsäure mit Schwefelwasserstoff und Salzsäure unter Zusatz von 5 ccm Wasser.

1 mg		2 mg	
Gefunden mg	Wiedergefunden %	Gefunden mg	Wiedergefunden %
1,01	101	1,45	72,5
1,04	104	1,79	89,5
0,99	99	1,87	93,5
im Mittel:	101,3	1,49	74,5
		im Mittel:	85,75

Durch den Wasserzusatz ließ es sich also erreichen, daß wir bei der Verarbeitung von 1 mg Harnsäure konstant ca. 100% und bei Verarbeitung von 2 mg im Mittel ca. 85% wiederfanden. Eine weitere Annäherung der gefundenen Werte an die Ausgangsmenge ließ sich nicht erreichen. Man kann demnach sagen, daß die nach der Folinschen Methode gefundenen Werte, wenigstens bei der von uns angewandten Technik, keine absoluten sind, wohl aber ziemlich konstante relative Werte darstellen, die uns für unsere Versuche sehr wohl geeignet erscheinen durften. Die Resultate, die wir bei

der Bestimmung von zu Organextrakten zugesetzter Harnsäure erhielten, sind denen ähnlich, die wir bei unseren Vorversuchen mit bekannten Mengen erhalten hatten; d. h. wenn wir auf 5 ccm unserer Extrakte 1 mg Harnsäure zugesetzt hatten, so fanden wir etwa 100% wieder, dagegen bei Zusatz von 2 mg auf 5 ccm Extrakt ca. 80—85%.[1]) Doch sind diese Resultate nicht ganz so gut, wie sie erscheinen, da dabei der allerdings recht geringfügige ursprüngliche Harnsäuregehalt der Organe nicht mitgerechnet ist. Immerhin waren auch beim Arbeiten mit Organextrakten die erhaltenen Werte, wenn auch sicher nicht absolut, so doch relativ ziemlich genau, und daher ist die Methode gewiß geeignet, eine Zunahme oder Abnahme der Harnsäure in Organextrakten zu kontrollieren.

Bei der Bestimmung der Harnsäure in den Organextrakten verfuhr ich immer so, daß ich je 5 ccm verarbeitete und allemal 2 Parallelbestimmungen ansetzte. Die Übereinstimmung zwischen zwei derartigen Bestimmungen von Proben desselben Extraktes war bisweilen geradezu frappant: Garnicht selten erhielt ich Werte, die auf ein Hundertstel Milligramm genau übereinstimmten. Derartig gute Resultate bei einer kolorimetrischen Methode dürften wohl als zufällig anzusprechen sein, aber sie demonstrieren immerhin den Wert, den die Methode auch für die Bestimmung der Harnsäure in eiweißhaltigen Flüssigkeiten hat. Für gewöhnlich wird man eine Differenz von 0,1—0,2 mg zwischen zwei Proben desselben Extraktes als innerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegend ansehen müssen. In verhältnismäßig seltenen Fällen haben wir allerdings auch größere Differenzen gefunden. Diese dürften zum Teil darauf beruhen, daß namentlich bei Organextrakten, die schon längere Zeit der Autolyse anheimgefallen sind, wegen auftretender Gerinnselbildung ein ganz scharfes Pipettieren kaum noch möglich ist.

Die unterste Grenze für die Möglichkeit einer einiger-

---

[1]) Auch Steinitz hat bei seinen Versuchen, zu Blut zugesetzte Harnsäure zu bestimmen, ca. 80% wiedergefunden und schlägt vor, aus dem relativen Wert den absoluten durch Multiplikation mit $^5/_4$ zu ermitteln.

maßen scharfen Einstellung der unbekannten Flüssigkeit auf den Farbwert der üblichen Vergleichslösung liegt, bei einer Verdünnung auf 50 ccm und bei Verarbeitung von 5 ccm Extrakt, ungefähr bei einem Gehalt von 0,2 mg Harnsäure. Bis zu dieser Grenze differierten unsere abgelesenen Werte der Schichtdicke im allgemeinen untereinander nicht mehr als um 1—2 mm, darunter wurden aber die Differenzen oft recht groß, so daß das schließlich erhaltene Resultat kaum als einwandsfrei zu betrachten war. Neben optischen Gründen mag für die Erklärung dieses Mißstands auch der oft ziemlich reichlich vorhandene Organfarbstoffgehalt der Flüssigkeit in Betracht kommen, der natürlich bei einer an sich sehr schwach blau gefärbten Lösung weit störender wirken muß, als bei einer tiefblauen, viel Harnsäure enthaltenden Lösung. Gelegentlich wirkte bei der Untersuchung solcher minimalen Mengen der Farbstoffgehalt derartig störend, daß auf eine Bestimmung der Harnsäure überhaupt verzichtet werden mußte.

Es sei hier ferner noch darauf hingewiesen, daß die blaue Farbe der unbekannten Lösung stets auffallend viel schneller verblaßt als die der Vergleichslösung. Auch daraus ergibt sich, mindestens bei nicht sehr schnellem Arbeiten, eine Fehlerquelle.

Erste Versuchsreihe.

Zerstörung von Harnsäure in Leberextrakten ohne Luftdurchleitung.

Wir haben zunächst eine Reihe von Versuchen angestellt, bei welchen den Organextrakten reine Harnsäure, als Lithiumsalz gelöst, zugesetzt wurde, um eine etwaige Harnsäurezerstörung mit Hilfe der Folinschen Methode zu verfolgen. Und zwar beschränkten wir uns zunächst auf Extrakte der Leber, als desjenigen Organes, das dem derzeitigen Stand unserer Kentnisse nach mindestens quantitativ die größte Bedeutung für den intermediären Stoffwechsel haben soll.

Die Extrakte wurden aus den Lebern verschiedener Tiere hergestellt, und zwar von der Katze, vom Hund, von Kaninchen und von Vögeln. Die möglichst frisch entnommenen

Lebern wurden mit der Hackmaschine oder dem Hackmesser sorgfältig zerkleinert und dann mit etwa ebensoviel Kubikzentimetern Wasser versetzt, als das Gewicht des zerkleinerten Organes in Grammen betrug, und mehrere Stunden, gewöhnlich über Nacht, an einem kühlen Orte stehen gelassen. Dann wurde der flüssige Anteil des Gemisches durch ein Tuch koliert, der Rückstand mit Kieselguhr verrieben und so weitgehend wie möglich mit einer Handpresse ausgepreßt. Colat und Preßsaft wurden vereinigt und stellten eine ziemlich intensiv rot gefärbte, trübe, aber anscheinend homogene Flüssigkeit dar, in der gröbere Partikel makroskopisch nicht zu erkennen waren.

Dann wurde eine genau abgewogene Menge mehrmals umgefällter, durch Kjeldahl-Bestimmungen auf ihre Reinheit geprüfter Harnsäure in einem 100 ccm Meßkolben in einigen Kubikzentimetern 0,4%iger Lithiumcarbonatlösung gelöst, eine abgemessene Menge des Extraktes (55—75 ccm) zugegeben und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Konzentration der zugesetzten Harnsäure betrug pro 5 ccm Extrakt 1 oder 2 mg, überschritt also die physiologische Konzentration in den Gewebssäften nicht allzuerheblich und blieb innerhalb der Grenzen, in denen wir bei unseren Vorversuchen befriedigende Resultate erhalten hatten. Zu gleicher Zeit wurde ein «Leerextrakt» hergestellt, das die gleiche Menge Extrakt wie das Harnsäureextrakt enthielt, aber nicht mit Harnsäure versetzt wurde. Nachdem die Meßkolben bis zur Marke aufgefüllt worden waren, wurden die Flüssigkeiten gut umgeschüttelt, in kleine Glasflaschen mit eingeschliffenen Stopfen überführt, beide, das Harnsäureextrakt und das Leerextrakt, mit der gleichen Menge Toluol versetzt und nochmals umgeschüttelt. Die Extrakte hielten sich so ohne Fäulniserscheinungen wochenlang; wohl aber setzten nach wenigen Tagen autolytische Prozesse ein, die sich in einer Ausflockung von Eiweißstoffen äußerten, die auf der klar gewordenen Flüssigkeit schwammen. Außerdem schlug die rote Farbe der Extrakte nach einigen Tagen in ein mißfarbenes Braun um. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß bei derartigen alten Extrakten ein scharfes Pipettieren

kaum möglich war, woraus wohl zum Teil die gelegentlichen großen Differenzen zwischen zwei Parallelbestimmungen zu erklären sind.

Auf Halten bei Brutofentemperatur und auf Luftdurchleitung durch die Extrakte wurde bei dieser ersten Versuchsreihe verzichtet.

Die erste Bestimmung wurde gleich nach dem Ansetzen des Extraktes begonnen. Immer wurden 2 Parallelbestimmungen mit je 5 ccm des Extraktes zugleich angesetzt. Anfangs wurde möglichst jeden Tag eine Bestimmung vorgenommen; nach längerem Stehen wurden die Proben in größeren Zeitabständen entnommen.

Die Resultate dieser Versuche sind aus Tabelle III bis VIII ersichtlich. In sämtlichen Leberextrakten, mit Ausnahme des aus Vogelleber hergestellten, konnte eine umfangreiche Harnsäurezerstörung nachgewiesen und in ihrem zeitlichen Verlauf gut verfolgt werden. Eine Harnsäurebildung aus präformiertem Purinmaterial der Extrakte konnte nicht sicher nachgewiesen werden. In den beiden Extrakten allerdings, denen auf 5 ccm 1 mg Harnsäure zugesetzt worden war (Tabelle III und IV), sowie in den meisten Leerextrakten, kamen in den ersten Tagen kleine Schwankungen des Harnsäuregehaltes nach oben vor. Doch waren diese so gering, daß sie innerhalb der Versuchsfehler lagen. Immerhin ist bemerkenswert, daß bei den beiden Extrakten mit Zusatz von 1 mg auf 5 ccm der Harnsäurespiegel mehrere Tage lang auf derselben Höhe blieb und erst verhältnismäßig spät deutlich absank. Bei den Extrakten dagegen, denen 2 mg auf 5 ccm zugesetzt worden waren, ließ sich die Harnsäureabnahme gleich am Tage der dem Ansetzen des Extraktes folgte, nachweisen. Dieses verschiedene Verhalten von Extrakten mit geringerem und solchen mit stärkerem Harnsäuregehalt läßt sich nun vielleicht so erklären, daß bei ersteren die Harnsäurebildung und -zerstörung sich einige Tage das Gleichgewicht halten und daß die Zerstörung erst nach Verbrauch alles harnsäurebildenden Materials offensichtlich wird, während dagegen in den relativ viel Harnsäure enthaltenden Extrakten eine etwaige geringe Neu-

bildung schon von Anfang an durch den umfangreicheren Abbau verdeckt wird. Aber irgend welche bindenden Schlüsse möchten wir aus diesen Unterschieden nicht ziehen.

Prinzipiell anders als die Leberextrakte von Katze, Hund und Kaninchen verhielt sich ein Extrakt aus Vogelleber (Tabelle VIII). Hier ließ sich, auch nach wochenlangem Stehen keine deutliche Harnsäurezerstörung nachweisen, sondern im Gegenteil, wenigstens im Leerextrakt eine deutliche Zunahme der Harnsäure. Diese Beobachtung steht natürlich völlig mit dem in Einklang, was wir von der Rolle, die die Harnsäure und die Leber im Vogelorganismus spielen, wissen. Hier liegt aber zugleich ein guter Kontrollversuch dafür vor, daß die Harnsäure aus den Leberextrakten anderer Tiere wirklich durch fermentativen Abbau verschwand und nicht etwa ausgefallen war; denn ein Ausfallen und Verschwinden hätte dann auch in dem genau so wie die anderen Extrakte hergestellten Vogelleberextrakt stattfinden müssen.

Tabelle III.

Leber von der Katze.

Versuchstag	Zusatz von 1 mg Harnsäure auf 5 ccm Extrakt Gefunden Harnsäure in mg			Leerversuch Gefunden Harnsäure in mg		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	0,93	0,76	0,85	0,13	—	0,13
2	1,07	1,005	1,04	0,39	0,33	0,36
5	1,08	0,93	1,01	0,36	0,35	0,36
5	1,06	0,94	1,00	0,37	0,33	0,35
6	0,61	0,54	0,58	0,20	0,15	0,18
7	0,18	0,16	0,17	0,09	—	0,09
8	Spur	Spur	Spur	0	0	0

Die teilweise ungewöhnlich großen Differenzen, die sich zwischen den einzelnen Parallelbestimmungen der Tabelle VIII finden, sind wohl durch die hier besonders stark vorhandenen Gerinnungsprozesse in der Flüssigkeit bedingt gewesen. Immer-

Tabelle IV.

Leber von der Katze.

Versuchstag	Zusatz von 1 mg Harnsäure auf 5 ccm Extrakt Gefunden Harnsäure in mg			Leerversuch Gefunden Harnsäure in mg		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	1,02	0,95	0,99	0,31	0,19	0,25
2	0,84	0,77	0,81	0,30	0,29	0,30
4	0,98	0,76	0,87	0,45	0,40	0,43
5	0,75	0,75	0,75	0,37	0,34	0,36
6	0,66	0,63	0,65	0,28	0,25	0,27
7	0,39	0,36	0,38	0,10	0,095	0,10
8	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
9	0,16	Spuren	0,16	Spuren	Spuren	Spuren
14	0,12	Spuren	0,12	Spuren	Spuren	Spuren

Tabelle V.

Leber von der Katze.

Versuchstag	Zusatz von 2 mg Harnsäure auf 5 ccm Extrakt Gefunden Harnsäure in mg			Leerversuch Gefunden Harnsäure in mg		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	1,68	1,61	1,65	0,31	—	0,31
2	1,30	1,28	1,29	0,25	0,19	0,22
3	1,15	1,12	1,14	0,40	0,37	0,39
6	0,82	0,74	0,78	0,25	0,25	0,25
7	0,74	0,68	0,71	0,27	0,25	0,26
8	0,24	0,20	0,22	0,10	—	0,10
10	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
17	0	0	0	0	0	0

hin zeigen die Versuchsresultate, daß im Harnsäureextrakt keine deutliche Harnsäurezerstörung stattgefunden hatte, wohl aber im Leerextrakt eine deutliche Zunahme zu konstatieren war.

Tabelle VI.

Leber vom Hund.

Versuchstag	Zusatz von 2 mg Harnsäure auf 5 ccm Extrakt Gefunden Harnsäure in mg			Leerversuch Gefunden Harnsäure in mg		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	1,75	1,64	1,70	0,48	0,40	0,44
2	1,55	1,54	1,55	0,27	0,25	0,26
3	1,14	1,14	1,14	0,24	0,17	0,21
8	0,36	0,35	0,36	0,37	0,29	0,33
9	0,34	0,21	0,28	0,17	0,17	0,17
11	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren

Tabelle VII.

Leber vom Kaninchen.

Versuchstag	Zusatz von 2 mg Harnsäure auf 5 ccm Extrakt Gefunden Harnsäure in mg			Leerversuch Gefunden Harnsäure in mg		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	1,60	1,59	1,60	0,23	0,23	0,23
2	1,59	1,51	1,55	0,21	—	0,21
9	0,73	0,70	0,72	0,38	—	0,38
10	0,32	0,28	0,30	0,10	0,10	0,10
30	Spuren	Spuren	Spuren	0,21	Spuren	0,21
32	0,19	0,08	0,14	0,10	0,06	0,08

Zweite Versuchsreihe.

Einfluß der Luftdurchleitung auf die Harnsäurezerstörung in Leberextrakten.

Da wir bei unseren ersten Versuchen mit Leberextrakten, die unter Luftabschluß mehrere Tage sich selbst überlassen wurden, außer bei dem Extrakt aus Vogelleber keine Harnsäurebildung einwandsfrei hatten feststellen können, sondern immer nur eine deutliche Zerstörung beobachtet hatten, versuchten wir mittelst Luftdurchleitung durch die Extrakte

Tabelle VIII.

Leber von Vögeln.

Versuchstag	Zusatz von 2 mg Harnsäure auf 5 ccm Extrakt Gefunden Harnsäure in mg			Leerversuch Gefunden Harnsäure in mg		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	1,61	1,57	1,59	0,61	0,55	0,58
4	1,72	1,65	1,69	0,76	0,56	0,66
5	1,51	1,24!	1,38	0,65	0,61	0,63
6	1,43	1,41	1,42	0,61	0,58	0,60
8	1,75	1,61	1,68	0,67	0,67	0,67
15	1,75	1,42!	1,59	0,92	0,84	0,88
18	1,77	1,03!	1,40	1,23	0,72!	0,98

zum Ziel, d. h. zu einer einwandsfreien Harnsäurebildung, zu gelangen. Spielt doch die Luftdurchleitung in früheren Versuchen über Harnsäurebildung in Organextrakten eine geradezu integrierende Rolle. Um auch eine etwaige Harnsäurezerstörung unter dem Einfluß der Luftdurchleitung festzustellen, verfuhren wir zunächst so, daß wir wieder mit Harnsäure versetzte Extrakte und Leerextrakte nebeneinander, ganz wie in der ersten Versuchsreihe herstellten. Die Flaschen, in denen die Extrakte sich befanden, wurden sodann mit einer Saugpumpe verbunden und ein kräftiger Luftstrom durchgesaugt (Toluol wurde auch bei diesen Versuchen zugegeben). Die Luftdurchleitung erfolgte bei gewöhnlicher Temperatur.

Die Resultate dieser Versuche sind aus Tabelle IX und X ersichtlich. Auch mit Hilfe der Luftdurchleitung gelang es nicht, in Leberextrakten aus präformiertem Purinmaterial eine Harnsäurebildung hervorzurufen. Wohl aber hatte die Luftdurchleitung einen außerordentlich stark beschleunigenden Einfluß auf die Harnsäurezerstörung, wie ein Vergleich der Tabelle IX und X einerseits, und der Tabellen V bis VII anderseits ohne weiteres erkennen läßt. So ist der Harnsäuregehalt bei dem in Tabelle IX verzeichneten Versuch in dem mit Harnsäure versetzten Extrakt unter dem Einfluß 21stündiger Luftdurch-

Tabelle IX.

Leber vom Hund.

Zwischen der ersten und zweiten Bestimmung 21 St. Luftdurchleitung.

Versuchstag	Zusatz von 2 mg Harnsäure auf 5 ccm Extrakt Gefunden Harnsäure in mg			Leerversuch Gefunden Harnsäure in mg		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	1,54	1,51	1,53	0,21	—	0,21
2	0,28	0,26	0,27	0,06	—	0,06

Tabelle X.

Leber vom Hund.

Zwischen der ersten und zweiten Bestimmung 28 St. Luftdurchleitung; zwischen der zweiten und dritten Bestimmung 17 St. Luftdurchleitung.

Versuchstag	Zusatz von 2 mg Harnsäure auf 5 ccm Extrakt Gefunden Harnsäure in mg			Leerversuch Gefunden Harnsäure in mg		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	1,65	1,48	1,57	0,25	0,23	0,24
2	0,72	0,70	0,71	Spuren	Spuren	Spuren
3	0,12	Spuren	0,12	Spuren	Spuren	Spuren

leitung bereits am zweiten Versuchstag zu einem Werte heruntergegangen, der in dem Versuch der Tabelle VI erst am 9. Tage erreicht wird. Selbst in dem Leerextrakt ist der Harnsäure zerstörende Einfluß der Luftdurchleitung deutlich.

Dritte Versuchsreihe.

Zusatz von Purinbasen zu Leberextrakten.

Nachdem unsere Versuche, eine Harnsäurebildung in Leberextrakten aus Stoffen zu erhalten, die in diesen selbst enthalten sind, negativ verlaufen waren, gingen wir dazu über, einige Versuche unter künstlichem Zusatz von Purinbasen vorzunehmen. Wir verwandten Guanin und Adenin, die in geringen

Konzentrationen, nachdem sie in Lösung gebracht worden waren, den sonst auf die übliche Weise bereiteten Extrakten zugesetzt wurden. Auch bei diesen Versuchen wurde jeweils gleichzeitig ein Leerextrakt hergestellt.

Besondere Schwierigkeiten machte es uns, bei diesen Versuchen das Guanin in Lösung zu bringen, denn die Salze dieser Base werden durch Wasserzusatz sofort unter Ausfallen des Guanins hydrolytisch gespalten; es gelingt also nicht, das Guanin in dieser Form in Lösung zu bringen. Dies kann man vielmehr nur durch einen starken Alkali- oder Säureüberschuß erreichen, der natürlich leicht die Fermente zerstören kann. Wir haben bei unseren Versuchen dem Guanin unter Erwärmen in Wasser allmählich soviel Alkali zugesetzt, daß es in Lösung ging. Aber das zugesetzte Alkali reichte aus, nach Zugabe des Organauszugs die rote Farbe des Blutfarbstoffs sofort in Braun umschlagen zu lassen. Wir haben später (s. u.) versucht, das Guanin durch tropfenweisen Zusatz von Schwefelsäure zur Lösung zu bringen, aber die entsprechenden Resultate waren noch weniger ermutigend. Im allgemeinen dürfte es sich empfehlen, bei Fermentversuchen für die Lösung des Guanins das Alkali, als das kleinere Übel, zu wählen. Weniger Schwierigkeiten machte uns das Adenin, das sowohl in Form seines Sulfates leicht in Wasser löslich ist, als auch weit weniger Alkali erfordert, wenn man die freie Base lösen will.

Die Resultate dieser Versuche sind aus Tabelle XI bis XIII ersichtlich. Mindestens ein sehr weitgehender Übergang von Guanin oder Adenin in Harnsäure ließ sich auch hier nicht nachweisen. In einem Falle allerdings (Tabelle XI) ist in dem Guaninextrakt ein Ansteigen des Harnsäuregehalts vom 2. bis 4. Versuchstag zu konstatieren, der wohl außerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegt (um mehr als 0,3 mg pro 5 ccm) und im Leerextrakt vermißt wurde. Nachfolgende Luftdurchleitung führte aber wieder zur Zerstörung der geringfügigen neugebildeten Harnsäuremengen.

Das negative Resultat des in Tabelle XII mitgeteilten Guaninversuchs kann wohl aus dem starken Alkaligehalt des

Extraktes erklärt werden (3 ccm 2-n-NaOH auf 100 ccm Extrakt). Aber auch der in Tabelle XIII verzeichnete Adeninversuch ist in Bezug auf eine Harnsäurebildung negativ verlaufen, obgleich nur 3 ccm $^1/_{10}$-n-NaOH zur Neutralisation der Schwefelsäure des Adeninsulfats zugesetzt worden waren und keine Veränderung der Farbe des Extraktes auftrat.

Tabelle XI (Guaninversuch).

Leber von der Katze.

Zwischen dem 4. und 5. Versuchstag 24stündige Luftdurchleitung.

Versuchstag	Zusatz von 40 mg Guanin auf 100 ccm Extrakt in 6 ccm $^1/_{10}$-n-NaOH gelöst			Leerversuch Zusatz von 6 ccm $^1/_{10}$-n-NaOH auf 100 ccm Extrakt		
	Gef. Harnsäure in mg in 5 ccm.			Gef. Harnsäure in mg in 5 ccm		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	0,14	Spuren	0,14	0,10	Spuren	0,10
2	0,22	0,17	0,20	0,09	„	0,09
4	**0,59**	**0,53**	**0,56**	0,18	0,10	0,14
5	0,17	0,12	0,15	kaum Spuren	—	—

Tabelle XII (Guaninversuch).

Leber von der Katze.

Zwischen dem 6. und 7. Versuchstag 21stündige Luftdurchleitung; zwischen dem 7. und 8. Versuchstag 23stündige Luftdurchleitung.

Versuchstag	Zusatz von 40 mg Guanin auf 100 ccm Extrakt in 3 ccm 2-n-NaOH gelöst			Leerversuch Zusatz von 3 ccm 2-n-NaOH auf 100 ccm Extrakt		
	Gef. Harnsäure in mg in 5 ccm			Gef. Harnsäure in mg in 5 ccm		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	0,20	0,17	0,19	0,17	0,15	0,16
2	0,23	0,17	0,20	0,18	0,18	0,18
3	0,13	Spuren	0,13	0,14	0,12	0,13
5	0,18	0,10	0,14	0,10	0,10	0,10
6	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
7	0,13	„	0,13	„	„	„
8	Spuren	„	Spuren	„	„	„

Tabelle XIII (Adeninversuch).

Leber vom Hund.

Versuchstag	Zusatz von 40 mg Adeninsulfat und 3 ccm $^1/_{10}$-n-NaOH auf 100 ccm Extrakt			Leerversuch		
	Gef. Harnsäure in mg in 5 ccm			Gef. Harnsäure in mg in 5 ccm		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	Spuren	Spuren	Spuren	0,22	0,14	0,18
4	0,41	0,28	0,35	0,37	0,32	0,35
6	0,23	0,14	0,19	0,30	0,21	0,26

Vierte Versuchsreihe.

Versuche mit Rindermilz.

Wir haben nun weiterhin noch einige Versuche über das Verhalten der Harnsäure gegen Milzextrakte angestellt. Diese Versuche schienen uns umso unerläßlicher zu sein, als die Milz ja in früheren Versuchen über Harnsäurebildung in Organextrakten eine besonders wichtige Rolle gespielt hat. Beziehen sich doch Horbaczewskis Untersuchungen über Harnsäurebildung in erster Linie auf Milzpulpa.

Für unsere Untersuchungen verwandten wir die Milz des Rindes, da die Milz der Tiere, deren Lebern wir früher verarbeitet hatten, zu klein für die Herstellung von Extrakten sind. Die Herstellung der Milzextrakte geschah ähnlich wie bei den Leberextrakten: Nachdem die Milzkapsel abpräpariert war, wurde das Parenchym durch die Fleischhackmaschine gehen lassen, wobei sich Pulpa und Trabekelwerk gut von einander trennten. Der Pulpabrei wurde mit Wasser extrahiert wie bei den Leberversuchen; bei dem ersten Versuche (Tabelle XIV) wurde mit der gleichen Menge, bei den folgenden Versuchen mit der doppelten Menge Wasser, als das Gewicht des Breies betrug, versetzt.

Eine deutliche Harnsäurebildung ließ sich bei allen unseren Milzversuchen nachweisen. Der erste Versuch (Tabelle XIV) wurde unter Zusatz von Xanthin und Hypoxanthin, sowie unter

Luftdurchleitung und bei einer Temperatur von 40—45°, angestellt. Eine Harnsäureneubildung trat sowohl im Xanthin-, wie auch im Hypoxanthin- und Leerextrakt auf. Im Xanthinextrakt war eine gewisse Mehrbildung von Harnsäure gegenüber den anderen Extrakten vorhanden. Sehr erheblich war der Unterschied aber nicht. Der Hypoxanthin- und Leerversuch wiesen jedenfalls keinen bemerkenswerten Unterschied in ihrem Harnsäuregehalt untereinander zu Ende des Versuches auf.

Ähnlich verlief ein Versuch mit Guanin- und Adeninsulfat (Tabelle XV), der ebenfalls unter Luftdurchleitung und bei Brutofentemperatur vor sich ging. Er verlief übrigens bei einem leichten Grade von Fäulnis, da in diesem Falle das Taluol weggelassen wurde und statt dessen je 5 ccm Maschinenöl zur Vermeidung des lästigen Schäumens bei der Luftdurchleitung zugesetzt wurden. Dabei stieg im Adenin- und Leerextrakt die Menge der Harnsäure zweifellos an, sogar, allerdings innerhalb der Versuchsfehler, im Leerextrakt etwas mehr als im Adeninextrakt. Im Guaninextrakt blieb, innerhalb der Fehlergrenzen, die Menge der Harnsäure gleich, was wohl auf eine Vergiftung der Fermente durch die zugesetzte Schwefelsäure zu beziehen ist.

In einem dritten Versuche nun (Tabelle XVI), haben wir einen Milzauszug unter denselben Bedingungen, unter Harnsäurezusatz (in Li_2CO_3-Lösung), tagelang stehen lassen wie die Leberextrakte der ersten Versuchsreihe. Bei Ausschluß von Fäulnis (Toluolzusatz) und ohne jede Luftdurchleitung und bei Zimmertemperatur ließ sich hier, mindestens im Leerextrakt, eine deutliche Harnsäurebildung nachweisen. Hingegen ist die Harnsäurezerstörung in dem mit Harnsäure versetzten Extrakt mindestens viel geringer als in den Leberextrakten; nach einigen Schwankungen des Harnsäuregehaltes nach oben und unten wurde er am 7. Versuchstage noch ungefähr gleich hoch gefunden wie sofort nach dem Ansetzen des Extraktes.

Wir haben an dieser Stelle unsere Versuche abgebrochen und haben die Absicht, sie gelegentlich systematisch fortzu-

Tabelle XIV.

Milz vom Rind.
(Xanthin- und Hypoxanthinversuch.)

Zwischen der ersten und zweiten Bestimmung 4stündige, zwischen der zweiten und dritten Bestimmung 7 ½ stündige Luftdurchleitung bei 40—45°.

Versuchstag	Zusatz von 40 mg Xanthin in 4 ccm $^1/_{10}$-n-NaOH gelöst auf 100 ccm Extrakt. Gefunden Harnsäure in mg in 5 ccm			Zusatz von 40 mg Hypoxanthin in 2,5 ccm $^1/_{10}$-n-NaOH gelöst auf 100 ccm Extrakt. Gefunden Harnsäure in mg in 5 ccm			Leerversuch. Gefunden Harnsäure in mg in 5 ccm		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1 a. m.	0,77	0,77	0,77	0,56	0,35	0,46	0,81	0,70	0,76
2 p. m.	1,55	0,87!	1,21	1,54	1,54	1,54	1,49	1,03	1,26
4	1,75	1,74	1,75	1,55	1,13	1,34	1,40	1,23	1,32

Tabelle XV.

Milz vom Rind.
(Guanin- und Adeninversuch.)

Zwischen der ersten und zweiten Bestimmung 10 ½ stündige Luftdurchleitung bei 40—45°.

Versuchstag	Zusatz von 60 mg Guaninsulfat, mit 20 Tr. 2-n-H_2SO_4 in Wasser gelöst, auf 100 ccm Extrakt. Gefunden Harnsäure in mg in 5 ccm			Zusatz von 60 mg Adeninsulfat auf 100 ccm Extrakt. Gefunden Harnsäure in mg in 5 ccm			Leerversuch. Gefunden Harnsäure in mg in 5 ccm		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	0,51	0,43	0,47	0,73	0,53	0,63	0,51	0,51	0,51
2	0,40	0,39	0,40	0,83	0,71	0,77	0,90	0,84	0,87

setzen. Sie dürften immerhin ein Beleg dafür sein, daß die Folin'sche Methode ein geeignetes Mittel ist, das Verhalten der verschiedenen Organextrakte gegenüber der Harnsäure zu verfolgen. Was diese Beziehungen selbst anbetrifft, so haben wir die Befunde älterer Autoren mittels dieser neuen Methode teilweise bestätigen können. Namentlich glauben wir, in

Tabelle XVI.

Milz vom Rind.

(Harnsäureversuch, keine Luftdurchleitung.)

Versuchstag	Zusatz von 2 mg Harnsäure auf 5 ccm Extrakt Gefunden Harnsäure in mg			Leerversuch Gefunden Harnsäure in mg		
	1	2	Mittelwert	1	2	Mittelwert
1	1,74	1,72	1,73	0,62	0,55	0,59
3	1,55	1,48	1,52	0,87	0,83	0,85
5	2,06	1,94	2,00	1,37	1,16	1,27
7	1,74	1,57	1,66	1,37	1,10	1,24
9	1,62	1,28!	1,45	1,04	1,01	1,03
11	1,49	1,41	1,45	1,24	1,23	1,24

unseren Untersuchungen einen neuen Beleg dafür erblicken zu können, daß die Leber der Säuger relativ mehr auf die Zerstörung, die Milz dagegen mehr auf die Bildung der Harnsäure eingestellt ist.

Nicht uninteressant ist es, daß wir auch beim Luftabschluß in Milzextrakten aus präformiertem Material eine deutliche Harnsäurebildung feststellen konnten. Es müssen demnach in den Organextrakten Kräfte vorhanden sein, die auch ohne Zufuhr gasförmigen Sauerstoffs, Oxydationsprozesse ermöglichen. Möglicherweise spielt hier der an den Blutfarbstoff der Extrakte gebundene Sauerstoff eine Rolle, doch haben wir den Eindruck gewonnen, daß die Harnsäurebildung noch eine Zeit lang weiterging, als die ursprüngliche rote Farbe der Extrakte bereits einem mißfarbenen Braun gewichen war, so daß wohl der Blutfarbstoff nicht den gesamten verfügbaren Sauerstoffvorrat gebunden hält.

Daß wir schließlich in Organextrakten, die zweifellos aus vorgebildetem Nucleinmaterial Harnsäure bildeten, also sicherlich die erforderlichen Fermente enthielten, doch durch zugesetzte Purinbasen mindestens kein sehr erhebliches Mehr an Harnsäure gegenüber den Leerextrakten erzielten, läßt immerhin die Frage aufwerfen, ob die freien Purinbasen wirklich ausschließlich über die Harnsäure abgebaut werden müssen,

bezw. ob der Abbau der Nucleinsäuren zur Harnsäure notwendig über die freien Purinbasen geht, und ob hier nicht vielmehr noch unbekannte Zwischenprodukte eine Rolle spielen können. Daß hier die Glycoside der Purinbasen in Betracht kommen, ist wenig wahrscheinlich, da wenigstens bei den tierischen Nucleinsäuren die Purinbasen außerordentlich locker an die Glukalgruppe gebunden sind.

Schließlich ist ja auch die alleinige Herkunft der Harnsäure aus den Nucleinsäuren keineswegs bewiesen. Daß sie im Vogelorganismus synthetisch entsteht, ist seit langem bekannt, aber es fehlt auch nicht an Versuchen, die für eine Synthese der Harnsäure im Säugetierorganismus sprechen (Wiener). Auch klinische Stoffwechseluntersuchungen lassen an solche Möglichkeiten denken. So teilt Umber in seinem „Lehrbuch der Ernährung und der Stoffwechselkrankheiten" (1909, S. 270) Beobachtungen an einer Gichtkranken mit, die $2^1/_2$ Jahre lang bei völlig purinfreier Kost beobachtet wurde und nach $1^1/_2$ Jahren noch 0,122 g Purinstickstoff täglich ausschied. Das wären, auf Harnsäure umgerechnet, 0,366 g pro die und ca. 133 g Harnsäure pro Jahr; in $2^1/_2$ Jahren also 333 g. Derartige Mengen nur aus dem Purinvorrat des Organismus herleiten zu wollen, dürfte wohl nicht gut möglich sein. Vielleicht kann gerade für die Beantwortung dieser noch ziemlich ungeklärten Fragen die Folin'sche Methode, die, wie wir gezeigt haben, recht geringe Schwankungen des Harnsäuregehaltes in Organextrakten registriert, noch gute Dienste leisten.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Prof. Steudel für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine mannigfache liebenswürdige Hilfe bei der Abfassung derselben meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Literatur.

A. Zur Methodik.

1. Folin und Denis, On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. Journ. of biol. chem., Bd. 12 (1912), S. 239.

2. Folin und Macallum, A new method for the (colorimetric) determination of uric acid in urine. Journ. of biol. chem., Bd. 13 (1912), S 363.

3. Folin und Denis, A new (colorimetric) method for the determination of uric acid in blood. Journ. of. biol. chem., Bd. 13 (1913), S. 469.

4. E. Steinitz, Untersuchungen über die Blutharnsäure. Diese Zeitschr., Bd. 90 (1914), S. 108.

5. R. Bass, Über die Purinkörper des menschlichen Blutes und den Wirkungsmodus des Atophans. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., Bd. 76 (1914), S. 40.

B. Über Harnsäurebildung und -Zerstörung.

6. H. Wiener, Die Harnsäure. Asher-Spiro, Ergebn. d. Physiol. Jahrg. I, 1. Abt. (1902), S. 555, woselbst die ältere Literatur zitiert ist.

7. S. Schindler, Über die Einwirkung der Fäulnis auf Guanin und Adenin. Diese Zeitschr., Bd. 13 (1889), S. 439.

8. A. Schittenhelm, Über die Harnsäurebildung in Gewebsauszügen. Diese Zeitschr., Bd. 42 (1904), S. 251.

9. A. Schittenhelm, Über die Fermente des Nucleinstoffwechsels. Diese Zeitschr., Bd. 43 (1904), S. 228.

10. R. Burian, Über die oxydative und vermeintliche synthetische Bildung der Harnsäure in Rinderleberauszug. Diese Zeitschr., Bd. 43 (1905), S. 497.

11. W. Jones und M. C. Winternitz, Über die Adenase. Diese Zeitschr., Bd. 44 (1905), S. 1.

12. A. Schittenhelm, Über die Harnsäurebildung und Harnsäurezersetzung in den Auszügen der Rinderorgane. Diese Zeitschr., Bd. 45 (1905), S. 121.

13. A. Schittenhelm, Über das urikolytische Ferment. Diese Zeitschr., Bd. 45 (1905), S. 161.

14. A. Schittenhelm, Der Nucleinstoffwechsel und seine Fermente bei Mensch und Tier. Diese Zeitschr., Bd. 46 (1905), S. 354.

15. W. Jones und C. R. Austrian, Über die Verteilung der Fermente des Nucleinstoffwechsels. Diese Zeitschr., Bd. 48 (1906), S. 110.

16. A. Schittenhelm und J. Schmid, Über die Fermente des Nucleinstoffwechsels. Diese Zeitschr., Bd. 49 (1906), S. 30.

17. F. Umber, Lehrbuch der Ernährung und der Stoffwechselkrankheiten. 1909, S. 270.

Lebenslauf.

Ich, Georg Rudolf Landmann, evangelisch-lutherischer Konfession, wurde geboren am 9. November 1888 zu Lauter in Sachsen, als Sohn des Fabrikbesitzers Paul Landmann und seiner Frau Marie geb. Breitfeld. Ich absolvierte das Gymnasium zu Schneeberg in Sachsen und erlangte daselbst im März 1908 das Zeugnis der Reife. Danach widmete ich mich dem Studium der Medizin an den Universitäten Freiburg, Marburg, München, Kiel und Heidelberg. Das Physicum bestand ich im August 1910 zu Freiburg, das Staatsexamen im Mai 1913 zu Heidelberg. Das vorgeschriebene praktische Jahr erledigte ich an der psychiatrischen und der medizinischen Universitätsklinik zu Heidelberg und auf der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Berlin, wo ich zurzeit als Assistent tätig bin.